

36 F 0
(16 B 67)

特許庁
特許公報

特許出願公告
昭41-5907
公告 昭41.3.30
(全4頁)

2-ケト-L-グロン酸の製造法

特願 昭 37-43886
出願日 昭 37.10.2
発明者 望月一男
宝塚市伊子志字円国寺 159 の 5
同 神崎俊彦
宝塚市鹿塩字高丸 1 の 35
同 岡崎尚良
吹田市山田下 520
同 土居宗晴
同 所
磯野正雄
西宮市菊谷町 43
中西造
大阪市東住吉区田辺東之町 5 の 34
同 笹島賢一
西宮市神垣町 27
出願人 武田薬品工業株式会社
大阪市東区道修町 2 の 27
代表者 三木孝造
代理人 弁理士 松居祥二

発明の詳細な説明

本発明は 2-ケト-L-グロン酸の製造法に関する。

2-ケト-L-グロン酸はビタミン C の合成中間体として有用なものであり、従来はたとえば、L-ソルボーズを硫酸の存在下アセトントで処理してジアセトン・ソルボーズにし、これを酸化してジアセトン-2-ケト-L-グロン酸にする方法、5-ケト-グルコニ酸を還元してイドン酸にしこれを微生物で酸化して 2-ケト-L-グロン酸にする方法等が知られているが、これらはいずれも数工程を要し、操作が複雑となり、また収率の低下も免れず、工業的にはかならずしも有利な方法であるとはいえないなかつた。

本発明者らはこのような事情に鑑み種々研究を行つた結果、ソルボーズより 1 工程で 2-ケト-L-グロン酸を生成する方法を見い出し本発明を完成した。

すなわち本発明はアセトバクター属に属する菌株をソルボーズを含有する培地に培養するか、この菌株の菌体処理物とソルボーズを接触させることを特徴とする 2-ケト-L-グロン酸の製造法である。

本発明方法における菌株は、アセトバクター属のう

ちでソルボーズより 2-ケト-L-グロン酸を生成するものであればいかなるものでもよく、これらの具体例としてはたとえばアセトバクター・サブオキシダンス、アセトバクター・キシリナム、アセトバクター・グルコニカム、アセトバクター・ルビギノーサス、アセトバクター・オオランチウム、アセトバクター・アルビダス、アセトバクター・セリナス、バクテリウム・オルレアネンス、アセトバクター・ジオキシアセトニカス、アセトバクター・カブストラトス、アセトバクター・ノンオキシグルコニカス、アセトバクター・メラノゲナム、アセトバクター・インダストリアム等が挙げられる。なおこれらの菌株をたとえば紫外線、X-線、ナイトロジエンマスターなどの変異剤によつて人工的に変異させた変異株も同様に用いうる。

これらの微生物は米国イリノイ州ペオリアの米国農務省北部利用研究所、ワシントン市の米国模範培養蒐集所、オランダ国バーンの微生物培養中央局、英國テデイントンの国立産業細菌蒐集所、また我国においては東大応用微生物研究所、財団法人発酵研究所のような公共の菌種保存機関から常時入手することができるし、また微生物学上現在用いられている手段で天然に存在するこれらの菌を単離することもできる。

なお本発明に使用する 2-ケト-L-グロン酸生産菌の選択はたとえば下記の方法によつて行うことができる。すなわち斜面培養により菌体を作り、以下のごとき培地に接種する。

培地例 1

ソルボーズ 2%、グリセリン 0.01%、ボリベブトン 0.05%、コーンスチーブリカ-1%、第一リン酸カリウム 0.003%、第二リン酸カリウム 0.007%、硫酸マグネシウム (7 水和物) 0.001%、硫酸第一鉄 (7 水和物) 0.001% 塩化ナトリウム 0.005%

培地例 2

ソルボーズ 2%、酵母エキス 0.5%

菌を接種した培地を 200 rpm ロータリーシェーカーで 28°C において培養し、適当時間毎に培養液を採取し、アンバーライト IR-120 (H型) で処理後水飽和フエノールを使用してペーパークロマトグラフィーを行つた。

2-ケト-L-グロン酸は Rf 約 0.2 にスポットが認められる。

また定量はペーパークロマトグラム上の 2-ケト-L-グロン酸を抽出し、ソモジー・ネルソン法を適用して行つた。

本発明方法においては、前記のごとき菌株をソルボーズを含有する培地に培養してもよく、またはその菌株の菌体処理物とソルボーズとを接触させてもよい。

前者の方法において細菌の培養は一般に酸化発酵の様式に従つて行われる。培養の手段としては静置培養でもよくまた通気搅拌培養でもよい。培地は通常液体培地が好ましいが、もちろん固型培地でもよい。

2-ケイ-*L*-グロン酸の生成に適當な栄養培地としては、目的を達しうるかぎり何ら特別の制限はなく、たとえば菌が同化しうる炭素源、窒素源、その他無機塩類、さらに微生物の栄養素等を適当に含有しているのが好ましい。すなわち窒素源としてはたとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチーブリカ、ペプトン、肉エキス、大豆粉、小麦粉、酵母エキス、酵母、尿素等の無機または有機の窒素含有物が、炭素源としては原料であるソルボーズの他に補助炭素源としてたとえばグリセリン、蔗糖乳糖、麦芽糖、デキストリン、糖蜜等が、無機塩類としてはたとえばカルシウム塩類、マグネシウム塩類、カリウム塩類、亜鉛塩類、銅塩類、その他の金属塩類等が、さらにまた必要に応じて目的物質生成促進因子等がそれぞれ用いられ、目的に応じてこれらの中から適宜に選択される。

これらの各栄養物質の配合割合、量等はたとえば使用する菌種、原料の使用量等によつても異なり、各場合に応じて最も適當な量を選択決定すればよい。

培地中のソルボーズの濃度はたとえば菌株の種類等によつても異なり一律にはいえないが通常約1～200g/l、特に約10～50g/l程度が好ましい。

培養条件はもちろん菌の種類、培地の組成等によつても異なるが通常約20～35℃付近の温度で培地のpHを約3～9に保持して培養を行うのが好ましい。培養時間は通常約10～200時間程度でよく、このあたりで2-ケイ-*L*-グロン酸の生成量が最大となる。

原料ソルボーズは培養開始時に培地に添加してもよく、また培養途上の適宜の時期に培地に添加してもよい。

なお培養中培地のpH値を常に酵素活性に適した値に保持するため、場合によつては培養の進行にともなつて培地中に適宜の塩基性物質あるいは酸性物質を適当量添加混合してもよく、また培地中に予め適宜の緩衝剤を適当量添加混合しておいてもよい。

本発明の方法においては、また前記のごとき菌体の菌体処理物とソルボーズとを接触させてもよい。菌体処理物としてはたとえば菌体または菌体磨碎物にアセトンを添加して生成する沈殿を採取乾燥したいわゆるアセトンパウダー等の形態のものが好んで用いられるが、その他生菌の細胞体、凍結乾燥処理した菌の細胞体、それらの磨碎物等も同様に用いられる。なおこの

場合の操作条件は前記の培養における条件に準じて適宜に選択決定すればよい。

また本発明者らの研究によると、菌体処理物を用いる場合、その菌体の生産する酵素がソルボーズに接触して2-ケト-*L*-グロン酸が生成されると考えられる。

かくして生成した2-ケト-*L*-グロン酸はその性状を利用した適宜の手段で分離精製する。なお2-ケト-*L*-グロン酸は遊離の酸として分離してもよく、たとえばナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム等の塩として分離してもよい。

分離の方法としては目的を阻害しないかぎりいかなるものでもよいが、たとえば必要に応じて反応生成物から濾過、遠心分離あるいは活性炭処理等を行つて菌体を除去した後、この発酵生成物溶液をそのまま濃縮、再結晶等により目的物をとり出す方法、溶媒で抽出する方法、たとえば活性炭、酸性白土、モレキュラーシーブ、1オン交換樹脂等の適宜の吸着剤と溶液とを接触させ目的物を吸着剤に吸着させついで適宜の溶媒で脱着して精製する方法等を単独で、適宜に組み合わせ、あるいは、反復適用することによつて行うこともできる。

なお2-ケト-*L*-グロン酸が遊離型で得られる場合はこれを適宜の方法によつてたとえばナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム等の塩にしてもよく、また塩として得られた場合はこれを適宜の方法によつて遊離型あるいは他の塩に変えてよい。

本発明における2-ケト-*L*-グロン酸の同定はたとえば元素分析、融点、赤外部吸収スペクトル、旋光度などの物理的性状によつても行いうる。

以上のごとき本発明の方法によれば、ソルボーズより一工程で2-ケト-*L*-グロン酸を得ることができ、操作も簡単であり、収率も良好で工業的にきわめて有意義である。

実施例 1

ソルボーズ2%、酵母エキス0.5%、炭酸カルシウム1%からなる培地150mlを内容1lの振盪びんに調整し、10lb/in²の蒸気圧で10分間滅菌する。この培地を含む振盪びん10本に、斜面培地上に2日間、28℃で培養したアセトバクター・サブオキシダンス・ATCC621のγ線照射変異株の殺菌水懸濁液10mlを接種し、28℃下5日間振盪培養した。

この培養液1lを炭末50gをしいた濾過器で吸引濾過する。ついで濾液をアンバーライトIR-120を充填した塔に通し、通過液を減圧下で濃縮すると2-ケト-*L*-グロン酸の結晶が析出する。本品は融点160℃を示したが、これを少許の水から再結晶したものと、そのメチル誘導体の融点・赤外部吸収スペクトルなど

(3)

特公昭41-5907

の物理的性状はソルボーズから合成法により得られた標準2-ケト-L-グロン酸およびそのメチル誘導体のそれと全く一致した。

遊離酸

融点: 165~166°C

元素分析: $C_6H_{10}O_7 \cdot H_2O$ として

計算値 C: 34.01%, H: 5.7%

実験値 C: 34.5%, H: 5.8%

メチル誘導体

融点: 154~155°C

元素分析: $C_6H_{12}O_7$ として

計算値 C: 40.28%, H: 5.62%

実験値 C: 40.3%, H: 5.9%

実施例 2

アセトバクター・サブオキシダンスATCC621のγ線照射変異株をソルボーズ2%、グルコース0.5%、酵母エキス0.5%からなる培地500mlにて18時間、30°Cで振盪培養を行い、これを種培養とした。

ソルボーズ5%、グルコース0.5%、酵母エキス0.5%、炭酸カルシウム2%からなる培地30ℓを50ℓのステンレス製培養タンクに仕込み、加圧滅菌後、上記の種培養500mlを移植し、培養温度28~29°C、通気量15~24ℓ/min、攪拌回転数280rpm、内圧15~20lb/in²で120時間培養した。

ここで得られた培養液中にはもはや原料基質のソルボーズは全く残存せず、2-ケト-L-グロン酸の生成量は約550mg/100mlであった。

培養液をシャープレス型遠心分離器にかけて菌体を除去し、透明な濾液約25ℓが得られた。この濾液1ℓに炭末50gを加えてから再び通過しついでアンバーライトIR-120(H型)を充填した塔を通過させて陽イオンを除去、ついでこれを減圧下に濃縮して2-ケト-L-グロン酸の結晶を析出せしめた。収量は濾液1ℓあたり4.5gであった。

実施例 3

ソルボーズ5%、酵母エキス0.5%、炭酸カルシム2%からなる培地150mlを内容1ℓの振盪びんに調製し10lb/in²の蒸気圧で10分間滅菌する。この培地を含む振盪びん10本に、斜面培地にて2日間培養したアセトバクターキシリヌムIF03144の柴外線変異株に殺菌水10mlを加えて懸濁液をつくり、その5ml宛を接種し、28°C毎分225回転の回転式振盪機で振盪培養する。7日目に培養を停止し、培養物を濾過し、菌体を除く。濾液をアンバーライトIR-120のカラムに通して脱塩し、次にアンバーライトIR-45に通して生成した2-ケト-L-グロン酸を吸着させ、水洗後1Nカセイカリで溶出する。

溶出液を活性炭で処理して脱色し、再びアンバーラ

イトIR-120のカラムに通して遊離の2-ケト-L-グロン酸溶液を得る。これをフラツシユエバボレーターで濃縮し、2-ケト-L-グロン酸の粗結晶5.4gを得た。

実施例 4

下記の組成を有する培地15mlを200ml振盪びんに分注滅菌し、アセトバクター・セリナス(IF03266)およびアセトバクター・サブオキシダンスの斜面培養からそれぞれ直接1白金耳接種し、28°C、200rpmのロータリー・シェーカーで7日間培養した。

培地 1

ソルボーズ2%、酵母エキス0.5%

培地 2

ソルボーズ2%、グリセリン0.01%、ポリペプトン0.05%、コーンスチーブリカ-1.0%、第一リン酸カリウム0.003%、第二リン酸カリウム0.007%、硫酸マグネシウム(7水和物)0.001%、硫酸第一鉄(7水和物)0.001%塩化ナトリウム0.005%

各培養時間にサンプルを採取し水飽和フェノールを使用してペーパクロマトグラフィーを行い、2-ケト-L-グロン酸相当部分より該物質を抽出し、ソモジーネルソン法により定量を行つた。結果は次の通りである。

表 1

| | 菌株 | 培養日数 | | |
|---|------------------|------|-----|-----|
| | | 3日 | 5日 | 7日 |
| 2酸 1含 ケ量 ト 1/ L/ 1ml グ ロ ン | アセトバクターセリナス | | | |
| | 培地1 | 105 | 190 | 185 |
| | 培地2 | 65 | 110 | 120 |
| | アセトバクター・サブオキシダンス | | | |
| | 培地1 | 80 | 126 | 145 |
| | 培地2 | 45 | 97 | 138 |

また同じ条件で、花から分離された未同定のアセトバクターに属する2菌株につき培養を行つた結果次のような数値が得られた。

表 2

| | 菌株 | 培養日数 | | |
|---|--------------|------|-----|------|
| | | 3日 | 5日 | 7日 |
| 2酸 1含 ケ量 ト 1/ L/ 1ml グ ロ ン | アセトバクター・A619 | | | |
| | 培地1 | 80 | 110 | 135 |
| | 培地2 | 80 | 95 | 125 |
| | アセトバクター・A668 | | | |
| | 培地1 | 460 | 890 | 1010 |
| | 培地2 | 290 | 580 | 880 |

実施例 5

実施例4に示したアセトバクター・セリナスにつき

タンク培養を行い生成物の同定を行つた。

前述の培地／500 mlを分注、滅菌した2 lの振盪びんにアセトバクター・セリナスの斜面培養1本を接種28℃で48時間振盪培養を行う。別に培地／30 lを50 lタンクに仕込み滅菌しておき上記種培養500 mlを接種、28℃ 260 rpm. 30 l/min の通気量で培養を行つた。

各培養時間の培養液を採取し実施例1と同じ方法により2-ケト-L-グロン酸を定量した結果は次の通りであつた。

培養日数

3日 5日 7日

2-ケト-L-グロン酸 r/ml 95 186 231

かくして得られた培養液26 lをハイフロスーパーペルを通して濾過し、濾液をアンバーライトIR-200 (H型)に通し、通過液をダウエツキスXE-168に通して2-ケト-L-グロン酸を吸着させる。つぎに1N-アンモニア水を用いて溶出し、溶出液を濃縮し、活性炭を加えて脱色処理後この処理液をアンバーライトIR-200の樹脂で処理し、pH約1.5にして2-ケト-L-グロン酸をダウエツキスXE-168に吸着せしめた後0.1Nアンモニア水で溶出し、溶出液を減圧濃縮して2-ケト-L-グロン酸の結晶4.5 gを得た。本品は標準2-ケト-L-グロン酸と同一の性状を示した。

実施例 6

実施例4の方法に従つて、下記の各菌株を培養し培養液のペーパークロマトグラフィー(展開溶媒として水飽和フェノールを使用)によつて、2-ケト-L-グロン酸の生成を認めた。

アセトバクター・サブオキシダンス ATCC 621
" " NRRL B-72
" " IFO 3256

| | | |
|------------------|-------------|-------------|
| アセトバクター・サブオキシダンス | IFO | 3254 |
| " | グルコニカム | ATCC 9324 |
| " | " | IFO 3285 |
| " | キシリナム | ATCC 10245 |
| " | ルビギノーサス | IFO 3243 |
| " | " | IFO 3244 |
| " | オーランチウム | IFO 3245 |
| " | " | IFO 3248 |
| " | " | IFO 3249 |
| " | アルビダンス | IFO 3250 |
| " | " | IFO 3251 |
| " | " | IFO 3253 |
| " | セリナス | IFO 3263 |
| " | " | IFO 3264 |
| " | " | IFO 3265 |
| " | " | IFO 3266 |
| " | " | IFO 3268 |
| " | " | IFO 3269 |
| " | " | IFO 3270 |
| " | デイオキシアセトニカス | IFO 3271 |
| " | メラノゲナム | IFO 3292 |
| " | " | IFO 3293 |
| アセトバクター・メラノゲナム | IFO | 3294 |
| " | ノンオキシグルコニカス | IFO 3275 |
| " | インダストリウム | IFO 3260 |
| " | カブスラトス | NRRL B-1225 |

特許請求の範囲

1 アセトバクター属に属する菌株をソルボースを含有する培地に培養するか、この菌株の菌体処理物とソルボーズを接触させることを特徴とする2-ケト-L-グロン酸の製造法。